

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP99/06682

30.11.99

4  
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

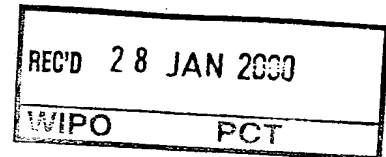
1998年12月 1日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第341253号

出 願 人  
Applicant(s):

伊東 恭悟  
住友製薬株式会社

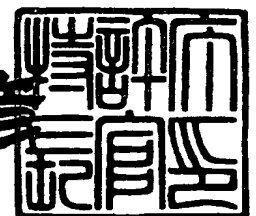


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3091525

【書類名】 特許願

【整理番号】 132548

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12  
C07K 7/00

【発明の名称】 新規な腫瘍抗原タンパク質ART-1、およびその腫瘍抗原ペプチド

【請求項の数】 20

【発明者】

    【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

    【氏名】 伊東 恭悟

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県久留米市長門石2-11-22-401

    【氏名】 五味 慎也

【特許出願人】

    【識別番号】 596094371

    【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

    【氏名又は名称】 伊東 恭悟

【特許出願人】

    【識別番号】 000183370

    【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

    【代表者】 横塚 實亮

【代理人】

    【識別番号】 100107629

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 中村 敏夫

    【電話番号】 06-466-5214

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な腫瘍抗原タンパク質ART-1、およびその腫瘍抗原ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）。

【請求項2】 配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNA、E. coli JM109(3D9)（受託番号FERM P-17062）が保有する外来性DNA、又はこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA（ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、その細胞内分解により、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）。

【請求項3】 請求項1または2記載のDNAを有する発現プラスミド。

【請求項4】 請求項3記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。

【請求項5】 請求項4記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法。

【請求項6】 請求項1または2記載のDNAによりコードされるか、または請求項5記載の生産方法により生産される、腫瘍抗原タンパク質。

【請求項7】 請求項1または2記載のDNA、あるいは請求項6記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬。

【請求項8】 請求項1または2記載のDNA、あるいは請求項6記載のタンパク質を有効成分として含有する、腫瘍の治療剤または予防剤。

【請求項9】 請求項6記載のタンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原

ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項 10】 HLA 抗原が HLA-A24 である請求項 9 記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項 11】 配列番号：3～配列番号：18 のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項 10 記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項 12】 配列番号：3～配列番号：5 のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項 11 記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項 13】 配列番号：3～配列番号：5 のいずれかに記載のアミノ酸配列の第 2 位および／または C 末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項 12 記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

【請求項 14】 配列番号：19～配列番号：21 のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項 13 記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

【請求項 15】 請求項 9～14 いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも 1 種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤。

【請求項 16】 請求項 6 記載のタンパク質、請求項 9～14 いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、のいずれかに特異的に結合する抗体。

【請求項 17】 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA 抗原と請求項 9～14 いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞。

【請求項 18】 請求項 17 記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

【請求項 19】 HLA 抗原と請求項 9～14 いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 20】 請求項 19 記載の細胞傷害性 T 細胞を有効成分として含有

してなる腫瘍の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれらを *in vivo* または *in vitro* で利用した腫瘍の治療剤または予防剤などに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体による腫瘍の排除には、免疫系、特に T 細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ (Arch.Surg., 126:200, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が比較的容易に分離されている (Immunol.Today, 8:385, 1987; J.Immunol., 138:989, 1987; Int.J.Cancer, 52:52, 1992等)。また、該 CTL の移入によるメラノーマ治療の臨床結果からも、腫瘍排除における T 細胞の重要性が示唆されている (J.Natl.Cancer.Inst., 86:1159, 1994)。

【0003】

自己の腫瘍細胞を攻撃する CTL が標的とする分子については長い間不明であったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわち CTL は、T 細胞受容体 (TCR) を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラス I 抗原 (MHC クラス I 抗原、ヒトの場合は HLA 抗原と呼ばれる) との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

【0004】

腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内で MHC クラス I 抗原

(HLA抗原)と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的CTLを増強させる治療法が可能となった。

#### 【0005】

腫瘍抗原タンパク質としては、1991年にT.Boonらが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定した (Science, 254:1643, 1991)。その後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質が、主にメラノーマ細胞から同定されている。メラノーマ抗原としては、メラノサイト組織特異的タンパク質である gp100 (J.Exp.Med., 179:1005, 1994)、MART-1 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91:3515, 1994)、チロシナーゼ (J.Exp.Med., 178:489, 1993) などのメラノソームタンパク質、メラノーマだけでなく各種癌細胞と正常精巢細胞に発現するMAGE関連タンパク質群 (J.Exp.Med., 179:921, 1994)、腫瘍特異的なアミノ酸変異を持つβ-カテニン (J.Exp.Med., 183:1185, 1996)、CDK4 (Science, 269:1281, 1995) などが同定されている。また、メラノーマ以外の腫瘍抗原タンパク質としては、HER2/neu (J.Exp.Med., 181:2109, 1995)、p53 (変異型) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93:14704, 1996) などの癌遺伝子産物、CEA (J.Natl.Cancer.Inst., 87:982, 1995)、PSA (J.Natl.Cancer.Inst., 89:293, 1997) などの腫瘍マーカー、HPV (J.Immunol., 154:5934, 1995)、EBV (Int.Immunol., 7:653, 1995) などのウイルスタンパク質などが同定されている。これらについては、総説 (Immunol.Today, 18:267, 1997、J.Exp.Med., 183:725, 1996、Curr.Opin.Immunol., 8:628, 1996等) の記述に詳しい。

#### 【0006】

腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを腫瘍の治療や診断に応用するためには、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い扁平上皮癌 (食道癌、肺癌等) などに幅広く適応可能な腫瘍抗原の同定が重要である。これに関して、本発明者

らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞から腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行い、HLAの型がHLA-A24あるいはHLA-A26であるHLA抗原に結合して提示されるいくつかの腫瘍抗原ペプチドを、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて同定した（J.Exp.Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号パンフレット）。

#### 【0007】

これらの腫瘍抗原ペプチドを実際に臨床に適用する際には、1種のみならず、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを使用することが望ましい。すなわち、全ての癌細胞が共通に同一の腫瘍抗原を発現しているとは限らず、また、一つの癌細胞上に2種以上の異なる腫瘍抗原ペプチドが提示されていることを考慮すると、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを用いた治療がより効果的であると考えられる。事実、メラノーマにおいては、単一の腫瘍抗原由来のペプチドのみでは効果が不十分であったことから、複数のペプチドのカクテル製剤の開発が試みられている（Int.J.Cancer, 66:162, 1996、Int.J.Cancer, 67:54, 1996）。このような背景から、例えば発生頻度の高い肺癌などの上皮性腫瘍において幅広く適用可能な、新たな腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドの同定が望まれている状況にある。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを提供することを目的とする。すなわち本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドおよびこれらの誘導体を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤または予防剤などを提供することを目的とする。本発明の腫瘍抗原ペプチドは、広範なヒト対象が保有している（例えば日本人の約60%が保有している）HLA抗原であるHLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドを含むものであることから、多くの腫瘍患者に適用可能であり、さらに肺癌、膀胱癌、骨肉腫等の上皮性腫瘍あるいは白血病といった幅広い腫瘍の治療または予防に応用可能なものであるため、新規な抗腫瘍剤としての有用性が予想される。



## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを得るために、以下の試みを行った。

まず本発明者らは、肺腺癌患者のリンパ球より、HLA-A24またはHLA-A2陽性の膀胱癌、肺癌、骨肉腫または白血病細胞株等を認識するCTL株を樹立し、これをKG-CTL（受託番号:FERM P-16854）と命名した。

つづいて、前記KG-CTLが強く反応する膀胱癌細胞株HT-1376からcDNAライブラリーを作製し、該ライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2402（HLA-A24の一種）cDNAの組換えプラスミドをCOS-7細胞にダブルトランスフェクトし、そのトランスフェクタントに先のKG-CTLを作用させ、KG-CTLが活性化されるか否かをIFN- $\gamma$ の産生量で測定するというスクリーニングを繰り返した。その結果、最終的に、1つの腫瘍抗原タンパク質の遺伝子のクローニングに成功した。塩基配列決定の結果、該腫瘍抗原タンパク質の遺伝子は新規な遺伝子であることが明らかとなった。本発明者らは、該遺伝子によりコードされる新規な腫瘍抗原タンパク質を、“ART-1”（Adenocarcinoma antigen Recognized by T cells-1）と命名した。

## 【0010】

本発明者らはさらに、ART-1のアミノ酸配列中、HLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド部分を同定し、これらのペプチドに腫瘍抗原ペプチドとしての活性の存することを明らかにした。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

## 【0011】

すなわち本発明は、

(1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）、

(2) 配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNA、E. coli JM109 (3D9) (受託番号FERM P-17062) が保有する外来性DNA、又はこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA (ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、その細胞内分解により、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)、

(3) 前記(1)または(2)記載のDNAを有する発現プラスミド、

(4) 前記(3)記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、

(5) 前記(4)記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法、

(6) 前記(1)または(2)記載のDNAによりコードされるか、または前記(5)記載の生産方法により生産される、腫瘍抗原タンパク質、

(7) 前記(1)または(2)記載のDNA、あるいは前記(6)記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬、

(8) 前記(1)または(2)記載のDNA、あるいは前記(6)記載のタンパク質を有効成分として含有する、腫瘍の治療剤または予防剤、

(9) 前記(6)記載のタンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(10) HLA抗原がHLA-A24である前記(9)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(11) 配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(10)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(12) 配列番号：3～配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(11)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(13) 配列番号：3～配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ

酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(12)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

(14) 配列番号: 19~配列番号: 21のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(13)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

(15) 前記(9)~(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤、

(16) 前記(6)記載のタンパク質、前記(9)~(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、のいずれかに特異的に結合する抗体、

(17) 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と前記(9)~(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞、

(18) 前記(17)記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤、

(19) HLA抗原と前記(9)~(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞、ならびに

(20) 前記(19)記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤、に関する。

【0012】

#### 【発明の実施の形態】

本発明のDNAは、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードするものであり、配列番号: 1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質、をコードするDNA(ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)、あるいは、配列番号: 2に記載の塩基配列を有するDNA、E.coli JM109(3D9)が保有する外来性DNA、又はこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA

(ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、その細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)が例示される。以下、これら本発明のDNAにつき順次説明する。

### 【0013】

#### 1) ART-1をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA」、「配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNA」とは、本発明のヒト由来の腫瘍抗原タンパク質ART-1をコードするDNAである。該DNAは、後述の実施例に記載の方法によりクローニングすることができる。また、配列番号：2に記載の塩基配列の適当な部分をハイブリダイゼーションのプロブあるいはPCRのプライマーに用いて、例えば膀胱癌細胞株HT-1376(ATCC番号CRL1472)由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても、クローニングすることができる。該クローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

### 【0014】

なお、前記ART-1のDNAを外来性DNAとして組込んだプラスミドを含有するE.coli JM109(3D9)は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号：FERM P-17062として寄託されている(受託日：平成10年11月25日)。

### 【0015】

#### 2) ART-1の改変タンパク質またはアレル変異体等をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：1に記載のアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質をコードするDNA」とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異体等のタンパク質をコードするDNAを意味し、この変異タンパク質をコードするDNAは、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻, Cold Spring Harbor Laboratory Press

(1989)に記載の種々の方法、例えば部位特異的変異誘発やPCR法等によって製造することができる。なお、ここで置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異誘発等の周知の方法により置換、欠失及び／又は付加できる程度の数を目指す。

【0016】

### 3) ART-1のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNA、又はE. coli JM109(3D9)が保有する外来性DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA」とは、例えばラット、マウス等の脊椎動物全てのART-1のDNAのような、前記ヒトART-1のDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを指す。

【0017】

ここで「ストリンジェントな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$  ( $20\times\text{SSC}$  は、 $333\text{mM Sodium citrate}$ 、 $333\text{mM NaCl}$ を示す)、 $0.5\%\text{SDS}$ および $50\%$ ホルムアミドを含む溶液中で $42^\circ\text{C}$ にてハイブリダイズさせた後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ の溶液中で $68^\circ\text{C}$ にて洗浄するような条件、あるいは、中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p.148-151、秀潤社、1995年、に記載の条件等を目指す。

【0018】

これら変異DNAは、例えば配列番号：2に記載のDNA等とのハイブリダイゼーションなどによりクローニングされるものであるが、具体的なcDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、ポジティブコロニーの選択、塩基配列の決定等の操作はいずれも公知であり、先のMolecular Cloning等を参照して行うことができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブとしては、例えば配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNA、E. coli JM109(3D9)が保有する外来性DNAなどが挙げられる。

【0019】

以上1)～3)に挙げたDNAのうち、「そのDNAが発現して生産されるタ

ンパク質が、その細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じる」という特性を有するものが、本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードするDNA、すなわち本発明のDNAとなり得る。すなわち、該DNAが発現して生産されるタンパク質の一部のアミノ酸配列からなる部分ペプチドがHLA抗原と結合可能であり、HLA抗原と結合して細胞表面に提示された場合、そのペプチド断片とHLA抗原との複合体に対して特異的なCTLが結合して細胞傷害作用やサイトカインの産生が誘導される、そのようなペプチド断片を生じるものが、本発明のDNAとなり得る。

#### 【0020】

ここで、候補となるDNAが腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAとなり得るか否かは、例えば以下のような方法により測定することができる。

すなわちまず、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS-7 (ATCC CRL1651) や繊維芽細胞VA-13 (理化学研究所細胞開発銀行) といった腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞に対し、候補となるDNAを有する発現プラスミドと、HLA抗原をコードするDNAを有する発現プラスミドとをダブルトランスフェクトする。該トランスフェクトは、例えばポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用いたりポフェクチン法などにより行うことができる。その後、用いたHLA抗原に拘束性の腫瘍反応性のCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン (例えばIFN- $\gamma$ ) の量を、例えばELISA法などで測定することによって、候補DNAが腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAであるか否かを調べることができる。なお、ART-1はHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を有するものであるため、前記HLA抗原をコードするDNAとしてはHLA-A24のcDNA (Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)) が挙げられ、前記CTLとしては、KG-CTL (FERM P-16854) などのHLA-A24拘束性のCTLが挙げられる。

以上のような活性測定の実施例は、後述の実施例2に記載されている。

#### 【0021】

以上のような本発明のDNAは、医薬の有効成分とすることができる。即ち、本発明のDNAを有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のDNAを腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防することができる。

## 【0022】

本発明のDNAを腫瘍患者に投与すると抗原提示細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は腫瘍の増殖・転移の予防が達成される。

本発明のDNAを投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

## 【0023】

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リボソーム法、リボフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リボソーム法が好ましい。

## 【0024】

本発明のDNAを実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

## 【0025】

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投

与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。in vivo法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のDNAを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（H V J）ーリポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のDNAを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0026】

本発明においてタンパク質とは、上記した本発明の種々のDNAによりコードされるタンパク質であり、その細胞内分解により、H-L A抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるといふ、腫瘍抗原タンパク質としての特性を有するものを指す。具体例としては、配列番号\* 1に記載のアミノ酸配列を有するART-1が挙げられる。これら本発明のタンパク質は、上記本発明のDNAを用いることにより、大量に製造することが可能である。

【0027】

本発明のDNAを発現して腫瘍抗原タンパク質を生産するには、例えば、前述のMolecular Cloning等の多くの成書や文献に基づいて実施することができる。すなわち本発明のDNAを、常法により適当な発現ベクター（例えばpSV-SPORT1、pCR3など）に組み込むことにより、発現プラスミドを作製する。次に発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への発現プラスミドの導入は、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、電気パルス法、リポフェクチン法などの公知の方法を用いれば良い。得られた形質転換体は、常法により該形質転換体に適した培地で培養することによって目的とするタンパク質を発現する。以上のようにして得られた腫瘍抗原タンパク質は、一般的な生化学



学的方法によって単離精製することができる。

【0028】

なお、本発明の腫瘍抗原タンパク質の活性は、前記したように、本発明のDNAを細胞内で発現させて本発明のタンパク質を産生させ、該タンパク質の細胞内分解により生じたペプチド断片が腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、確認することができる。また、得られた腫瘍抗原タンパク質そのものを用いて活性測定を行う場合には、例えばマクロファージなどの食細胞に本発明の腫瘍抗原タンパク質を取り込ませて細胞内でペプチド断片を生じさせ、その後、該ペプチド断片とHLA抗原との複合体に対してCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）の量を測定することなどによって、調べることができる。

【0029】

以上のような本発明のタンパク質もまた、医薬の有効成分とすることができる。即ち、本発明のタンパク質を有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のタンパク質を腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防することができる。本発明の腫瘍抗原タンパク質を腫瘍患者に投与すると抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は腫瘍の増殖・転移の予防が達成される。

【0030】

本発明の腫瘍抗原タンパク質を有効成分として含有する医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原タンパク質の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg~1000mg、好

ましくは 0.001mg~1000mg、より好ましくは 0.1mg~10mg であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。

## 【0031】

本発明において「腫瘍抗原ペプチド」とは、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつ HLA 抗原と結合して CTL により認識され得る腫瘍抗原ペプチドである。すなわち、前記した本発明の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドと HLA 抗原との結合複合体が CTL により認識され得るようなペプチドであれば、本発明の腫瘍抗原タンパク質中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであっても、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチドの範疇に含まれる。このような本発明の腫瘍抗原ペプチドは、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドと HLA 抗原との複合体が CTL により認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

## 【0032】

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては文献(ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善 (株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株), 1985; 医薬品の開発 続 第 14 巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

## 【0033】

次に、本発明の腫瘍抗原ペプチドの同定方法につき、以下に記述する。

HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602 などの HLA の型については、該 HLA に結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性 (モチーフ) が判明している (例えば Immunogenetics, 41:p178, 1995 など参照のこと)。例えば HLA-A24 のモチーフとしては、8~11 アミノ酸よりなるペプチドのうちの第 2 位のア

ミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンとなることが知られている (J.Immunol.,152,p3913,1994, Immunogenetics,41:p178,1995, J.Immunol.,155:p4307,1994)。またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている (Immunogenetics,41,p178,1995, J.Immunol.,155:p4749,1995)。

## 【0034】

【表1】

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8~11アミノ酸)

## 【0035】

ペプチドの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により (Immunogenetics, 41:178, 1995)、通常8から14アミノ酸程度であることが明らかにされている (ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの抗原ペプチドも認められる)。

## 【0036】

これらのモチーフに関わるペプチド部分を本発明の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列中から選び出すのは容易である。すなわち、腫瘍抗原タンパク質ART-1のアミノ酸配列 (配列番号: 1) を見れば、上記モチーフ構造に関わるペプチド部分を容易に選び出すことができる。選び出された候補ペプチドを前述の方法にて合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との結合複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

## 【0037】

本発明の腫瘍抗原ペプチドの具体的な同定法としては、例えば J.Immunol.,154,p2257,1995に記載の方法が挙げられる。すなわち、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、*in vitro*で該候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA抗原提示細胞を特異的に認識するCTLが誘導された場合は、該候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドに成り得ることが示される。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）の量を、例えばELISA法などによって測定することにより、調べることができる。また<sup>51</sup>Crで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（<sup>51</sup>Crリリースアッセイ、Int.J.Cancer,58:p317,1994）によっても調べることができる。

## 【0038】

さらに、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原のcDNAを発現する発現プラスミドを、例えばCOS-7細胞（ATCC No.CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞に対して候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、前記候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原に拘束性のCTLを反応させ、該CTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）の量を測定することによっても、調べることができる（J.Exp.Med.,187:277,1998）。

以上のような種々の活性測定の具体例は、後述の実施例8および実施例9に記載されている。

## 【0039】

なお、ART-1はHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を有するものである。HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合には、前記HLA抗原をコードするcDNAとしてはHLA-A24のcDNA（Cancer Res., 55:4248-4252（1995））を用い、前記CTLとしては、KG-CTL（FERM P-16854）などのHLA-A24拘束性のCTLを用いることにより、前記の腫瘍抗原ペプチドの同定を行うことができる。

## 【0040】

以上のような腫瘍抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している場合と異なり、例えばHLA-A26のようにそのペプチドのモチーフが明らかでない場合は、該HLA-A26と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するCTL株が存在する場合には、例えばW097/46676に記載の方法に準じて本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

なお、以上述べたような腫瘍抗原ペプチドの同定法を、以下、“腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法”と総称することもある。

#### 【0041】

前記したように、HLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、具体的には、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンとなることが知られている（J.Immunol.,152,p3913,1994, Immunogenetics,41:p178,1995, J.Immunol.,155:p4307,1994）。従って、本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、配列番号：1に記載のART-1のアミノ酸配列上、このようなモチーフ構造に関わる部分ペプチドであって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。

#### 【0042】

前記HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、具体的には、例えば配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。すなわち、

- 1) 配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、
- 2) 配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、

であって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A24抗原に結合して提示されるという観点から、8~11アミノ酸程度のものが挙げられる。

【0043】

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドの好適なものとしては、配列番号：3~配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。すなわち、

- 1) 配列番号：3~配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、
- 2) 配列番号：3~配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：3~配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、

であって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A24抗原に結合して提示されるという観点から、8~11アミノ酸程度のものが挙げられる。

【0044】

本発明において「腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有する誘導体」（以下、腫瘍抗原ペプチド誘導体と略す場合がある）とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列に対し、1又はそれ以上、好ましくは1~数個のアミノ酸残基の改変を施した改変体であって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての特性を有するものを指す。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列に対して1又はそれ以上のアミノ酸残基の改変を施した改変体であって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の範疇に含まれる。

## 【0045】

ここで、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、前記したように通常、腫瘍抗原ペプチドの長さが8～14アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の長さとしては、前記腫瘍抗原ペプチドと同様に8～14アミノ酸程度が好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある。）

## 【0046】

以上のような本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、本発明の腫瘍抗原ペプチドの一部を改変した改変体を前記ペプチド合成法に基づき合成し、これを前記腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法に供することにより、同定することができる。

## 【0047】

先に記載したように、HLA-A1、-A0201、-A0204、-A0205、-A0206、-A0207、-A11、-A24、-A31、-A6801、-B7、-B8、-B2705、-B37、-Cw0401、-Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。従って、該モチーフに基づき、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸を改変した腫瘍抗原ペプチド誘導体を作製することが可能である。

## 【0048】

例えばHLA-A24に結合して提示される抗原ペプチドのモチーフとしては、前記したように、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンであることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41: p178, 1995, J. Immunol., 155: p4307, 1994）。またHLA-A2の場合は、前記の表1に記載のモチーフが知られている。また、該モチーフ上とり得るアミノ酸に類

似の性質を持つアミノ酸残基も、許容される可能性がある。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、これらモチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置（HLA-A24、HLA-A2においては第2位とC末端）にあるアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列の全部又は一部を含むものであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるという活性を持つペプチド誘導体が挙げられる。好ましくは、該位置において、前記モチーフ上知られたアミノ酸残基の中から置換するアミノ酸残基を選択したアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。なお「全部又は一部」の長さとしては、8～14アミノ酸程度の長さが好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある）。

## 【0049】

ここで、HLA-A24に拘束性の腫瘍抗原ペプチドの誘導体としては、例えばART-1のアミノ酸配列上HLA-A24の結合モチーフを有するペプチドに対して、前記モチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置、すなわち第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上知られたアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。該HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体において「全部又は一部」の長さとしては、8～11アミノ酸程度が好ましい。

## 【0050】

具体的には、例えば配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。好ましくは、配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上知られたアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。すなわち、配列番号：3～配列番号：18のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位のアミノ酸



残基をチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンに置換し、および／またはC末端のアミノ酸残基をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。

## 【0051】

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適なものとしては、配列番号：3～配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。好ましくは、配列番号：3～配列番号：5のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンに置換し、および／またはC末端をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。このような腫瘍抗原ペプチド誘導体の例を、配列番号：19～配列番号：21に示す。

## 【0052】

本発明の腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体は、以下のように腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。

すなわち、腫瘍の治療又は予防を目的とする使用に際しては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体の少なくとも1種または2種以上を組み合わせ、要すれば他の腫瘍抗原ペプチド等と組み合わせて患者に投与する。本発明の腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤をART-1陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA抗原に腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体が高密度に提示され、提示されたHLA抗原複合体特異的CTLが増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、患者の腫瘍を治療し、又は腫瘍の増殖・転移を予防することができる。ART-1は、肺癌等の上皮性腫瘍に広範に発現しているので、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、適用範囲の広いことが有利である。さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤又は予防剤は、従来の化学療法や放射線療法と併用

することにより、治療効果を上げることも可能である。

#### 【0053】

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数  $\mu\text{m}$  のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常  $0.0001\text{mg} \sim 1000\text{mg}$ 、好ましくは  $0.001\text{mg} \sim 1000\text{mg}$ 、より好ましくは  $0.1\text{mg} \sim 10\text{mg}$  であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。

#### 【0054】

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子は、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することが可能である。

すなわち、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子を腫瘍の治療に用いる場合、患者の体内で効率良く特異的なCTLを誘導することの可能な投与法が重要になる。そのための手段のひとつとして、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させた抗原提示細胞、および該抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供するものである。

#### 【0055】

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示することの可能なHLA抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該

細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質そのものを体外でパルスしてHLA抗原と前記ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することにより得られる(Cancer Immunol.Immunother.,46:82,1998)。また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードする遺伝子を導入することによっても、最終的にHLA抗原と前記ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することができる。

## 【0056】

前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、ART-1陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療することができる。なお、HLA-A24に陽性の腫瘍患者に対してはHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体を使用するといった、患者と使用するペプチドとでHLAの型を合わせる必要のあることは言うまでもない。

## 【0057】

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子のイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J.Natl.Cancer.Inst.,86:1159、1994)。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J.Exp.Med.,185:453,1997)。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子を用

いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

#### 【0058】

すなわち本発明は、前記HLA抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識するCTL、および、該CTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤をも提供するものである。該治療剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、ART-1陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

#### 【0059】

本発明は、本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体をも提供するものである。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, Dら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。

#### 【0060】

該抗体を用いて前記免疫学的診断を行うには、まず前記抗体を必要に応じて適宜標識し、これを用いて腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍組織など)中の抗原の存在を検出することにより、腫瘍の有無を診断することができる。具体的にはイムノブロット法、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光あるいは発光測定法等により行うことができる。

#### 【0061】

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を診断薬として用い、前記血液又は腫瘍組織中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍の有無を診断することも可能である。

#### 【0062】

本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードするDNA、腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体、該腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示している抗原提示細胞、該腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体とHLA抗原との複合体を特異的に認識するCTLは、当該技術分野における研究用試薬としても有用である。

#### 【0063】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【0064】

##### 実施例1

##### 肺腺癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) からの細胞傷害性T細胞 (CTL) 株の樹立

肺腺癌患者の手術検体を培養液中で細切した後、コラゲナーゼ及びDNAaseを含む培養液中で攪拌して細胞を分散させた。細胞分散液からFicoll Conray溶液を用いて、比重遠心法によりリンパ球を分離した。リンパ球は、24穴プレートを用い、45%RPMI-1640、45%AIM-V (GIBCO BRL社)、10%FCSに、100U/mlインターロイキン-2、0.1mM NEAA (GIBCO BRL社製) を添加した培養液 (以下、リンパ球培養液と呼ぶ) で培養した。培養開始から2日間は、培養液中に抗CD3抗体のNU-T3 (ニチレイ社製) を $1\mu\text{g/ml}$ 添加した。30日以上培養を続け、HLA-A24またはHLA-A2陽性の何種類かの癌細胞株に反応するCTL株を樹立し、KG-CTLと命名して以下の実験に使用した。各種癌細胞株に対するKG-CTLの反応性は、96穴プレートに癌細胞株を $1\times 10^4$ 個/穴植え込み、翌日にKG-CTLを $1\times 10^5$ 個/穴添加して、更に18時間培養した後、培養液を回収してKG-CTLが産生したインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 量を測定することにより調べた。IFN- $\gamma$ の定量は、エンザイムイムノア

ッセイ(ELISA)により行った。すなわち、96穴プレートに固相化抗体として抗ヒトIFN- $\gamma$ マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中のIFN- $\gamma$ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- $\gamma$ ウサギモノクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体(アマシャム社製)を結合した後、ペルオキシダーゼ発色キットT(住友ベークライト社製)を用いて発色させた後、吸光度(405nm)を測定した。これをスタンダードのIFN- $\gamma$ で得られた値と比較することにより定量した。表2に、各種腺癌細胞株に対するKG-CTLの反応性を示す。また、表3にリンパ球系細胞株に対するKG-CTLの反応性を示す。

【0065】

【表2】

腺癌細胞株名称	KG-CTLが産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)	HLA-Aタイプ
HT-1376 (膀胱癌細胞株)	4608	2402/2402
1-87 (肺癌細胞株)	194	0207/1101
11-18 (肺癌細胞株)	4632	0201/2402
PC-9 (肺癌細胞株)	1102	0206/2402
LC-1 (肺癌細胞株)	129	3101/3302
YT-803 (肺癌細胞株)	285	3101/3302
143B (骨肉腫細胞株)	1547	0211/0211
なし(KG-CTLのみ)	100	—

【0066】

【表3】

細胞株	KG-CTLが産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)	HLA-Aタイプ
SSB (B細胞株 <sup>1)</sup> )	5769	2402/2402
Ban-B1 (B細胞株 <sup>1)</sup> )	78	3101/3302
HPB-MLT (白血病細胞株)	189	0101/0201
MOLT-16 (白血病細胞株)	13	2301/3002
MT-2 (白血病細胞株)	3495	2402/2402
なし(KG-CTLのみ)	0	—

1) 健常人のB細胞をEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株

【0067】

表2の結果より、KG-CTLは、表中のHLA-A2402陽性の癌細胞（HT-1376、11-18、PC-9）に強く反応してIFN- $\gamma$ を産生すること、HLA-A2陽性の癌細胞（143B）にも反応してIFN- $\gamma$ を産生することが示された。また表3の結果より、KG-CTLは、HLA-A2402陽性のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株や白血病細胞株（S SB、MT-2）に強く反応すること、HLA-A2陽性の白血病細胞（HPB-MLT）に対しても反応することが明らかになった。

【0068】

樹立された KG-CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-16854として寄託されている（受託日：平成10年6月19日）。なお、中尾ら著、Cancer Res.,55:4248-4252(1995)記載の方法に従い、KG-CTLのHLA分子のタイピングを行った結果（塩野義製薬(株)により実施）、AローカスはA0206及びA2402であることが確認された。

【0069】

実施例2

腫瘍抗原タンパク質の同定

実施例1でKG-CTLが強く反応した膀胱癌細胞株HT-1376（ATCC番号CRL1472）から以下の方法によりcDNAライブラリーを作製した。

まず、HT-1376からmRNA精製システム（ファルマシアバイオテック社製）を用い、添付のプロトコールに従い、全RNA画分の分離および oligo(dT)カラムによる poly(A)<sup>+</sup> mRNAの調製を行った。mRNAよりスーパースクリプトプラスミドシステム(GIBCO BRL社製)を用い添付のプロトコールに従い、両端にNotIアダプターとSalIアダプターを連結したcDNAを作製した後、このcDNAを発現ベクターのプラスミドpSV-SPORT1(GIBCO BRL 社製)の制限酵素NotIおよびSalIの切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10B<sup>TM</sup>セル(GIBCO BRL社製)に導入し、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml)を含むLB培地(1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキス、0.5%NaCl

、pH7.3)で組換えプラスミドが導入されている形質転換体を選択した。

#### 【0070】

この形質転換体の100個のプールからの組換えプラスミドDNAの回収は以下のように行った。すなわち、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml)を含むLB培地の入った96ウェルU底マイクロプレートにウェルあたり 100個の形質転換体を加え培養後、その一部をウェル当たり0.25mlのTYGPN培地(F.M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)の入った別の96ウェルU底マイクロプレートに移して37℃で48時間培養し、残りのLB培地のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN培地で培養した形質転換体の組換えプラスミドDNAは、マイクロプレートでアルカリ溶解法(F.M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)により調製した。イソプロパノール沈澱で回収した組換えプラスミドDNAは、50  $\mu$ lの20ng/ml RNaseを含む10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

#### 【0071】

一方、食道癌細胞株KE-4 (受託番号: FERM-BP-5955) から、中尾ら著、Cancer Res., 55:4248-4252(1995)の記載に従い、HLA-A2402のcDNAを発現ベクターpCR3 (INVITROGEN社製) に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

#### 【0072】

次に、アフリカミドリザルの腎臓由来の細胞株COS-7 (ATCC番号CRL1651) へ、リポフェクチン法により以下のようにHT-1376 cDNAの組換えプラスミドとHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした。すなわち、COS-7を96ウェル平底マイクロプレートにウェル当たり8000個を加えて、100  $\mu$ lの10% FCSを含むRPMI1640培養液で1日間培養した。リポフェクトアミン試薬(GIBCO BRL社製)を用い、形質転換体約100個分のHT-1376 cDNAの組換えプラスミド25  $\mu$ lとHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミド10  $\mu$ l(200ng)と約50倍に希釈したリポフェクチン試薬35  $\mu$ lの混合液70  $\mu$ lのうち、30  $\mu$ lをCOS-7に加えてダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200  $\mu$ lの10% FCSを含む培養液を加え、更に48時間、37℃で培養した後、培養液を除去し、ウェル当たり $1.5 \times 10^5$ 個のKG-CTLを加え



て100  $\mu$ lの10%FCSと25U/mlのIL-2を含む培養液で37℃で24時間培養した。培養後、培養液を回収し、実施例1に記載のELISA法にてIFN- $\gamma$ 量を測定した。

## 【0073】

高いIFN- $\gamma$ 産生が認められた群については、該当する凍結保存してあったHT-1376 cDNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約100個のプールを用いてさらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールをアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、各群400コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類となる条件で上記と同様の方法で培養し、HT-1376 cDNAの組換えプラスミドDNAを調製した。さらに上記と同様な方法で、COS-7へのHT-1376 cDNAの組換えプラスミドとHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクトを行い、引き続いてKG-CTLとの混合培養を行い、KG-CTLが反応して産生した培養液中のIFN- $\gamma$ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作により1つのHT-1376 cDNA組換えプラスミドクローンが選択され、これを3D9と命名した。3D9については、さらにもう一度、同様な操作を繰り返してKG-CTLによるIFN- $\gamma$ の産生量を測定した。その結果を以下の表4に示す。

## 【0074】

【表4】

細胞	KG-CTLが産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)
COS-7 + HLA-A2402	2152
COS-7 + HLA-A2402 + 3D9	2379

## 【0075】

KG-CTLは、COS-7にHLA-A2402のみをトランスフェクトした細胞に対してよりも、COS-7にHLA-A2402と3D9とをダブルトランスフェクトした細胞に対して、より強く反応してIFN- $\gamma$ を産生した。この結果から3D9がコードするタンパク質は、腫瘍抗原タンパク質であることが示された。

## 【0076】

## 実施例3

腫瘍抗原タンパク質遺伝子の塩基配列の決定

実施例 2 で得られた腫瘍抗原タンパク質をコードするプラスミドクローン 3D9 について DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing キット（パーキンエルマー社製）を使用して塩基配列を決定した。決定した塩基配列（1711 塩基対）を配列番号：2 に、また該塩基配列によりコードされるアミノ酸配列（414 アミノ酸）を配列番号：1 に、それぞれ示す。これらの塩基配列及びアミノ酸配列を、WWW-Entrez データベースを使用して既知の配列と比較した結果、プラスミドクローン 3D9 は新規な遺伝子であることが明らかとなった。3D9 によりコードされる本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質を、ART-1 (Adenocarcinoma antigen Recognized by T cells-1) と命名した。

## 【0077】

なお、上記の塩基配列決定後、プラスミド 3D9 を E.coli JM109 に導入し、新規な腫瘍抗原タンパク質 ART-1 の cDNA を含有する保存用の形質転換体である E.coli JM109 (3D9) を調製した。E.coli JM109 (3D9) は、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（受託日：平成 10 年 11 月 25 日；受託番号：FERM-P-17062）。

## 【0078】

## 実施例 4

候補ペプチドの選択

HLA 分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24 の場合、8～11 アミノ酸よりなるペプチドの第 2 位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンであり、C 末端のアミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン又はメチオニンであることが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J.Immunol., 152:3913, 1994、J.Immunol., 155:4307, 1994）。

## 【0079】

このようなモチーフに従い、本発明の腫瘍抗原タンパク質 ART-1 のアミノ酸配列から、HLA-A24 結合モチーフを有する 8～11 アミノ酸よりなるペプチド部分を 16 種類選択した。これら 16 種類のペプチドのアミノ酸配列を、配列番号：3～配列番号：18 に示す。これらのペプチドは、以下に示す Fmoc 法にて合成を行った。

## 【0080】

上記ペプチドが腫瘍抗原ペプチドであるか否かの同定は、以下のようにして行った。すなわち、HLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドを文献(J.Exp.Med., 187: 277, 1998)の記載に従い、 $10^4$ 個のCOS-7細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションしてHLA-A2402を発現させた。この細胞に対し、先に合成したHLA-A24の結合モチーフを有する各種ペプチドをそれぞれ $10\mu\text{M}$ で2時間添加してパルスした後、 $2\times 10^4$ 個のKG-CTLとともに18時間培養し、KG-CTLが産生した培養上清中のIFN- $\gamma$ 量をELISA法にて測定することにより腫瘍抗原ペプチドの同定を行った。

## 【0081】

以上のようなHLA-A24結合モチーフを有するペプチドの合成及び腫瘍抗原ペプチドの同定の具体例として、3種のペプチド、すなわち配列番号：1のアミノ酸配列の第170位から第179位の配列よりなるペプチド（配列番号：3、以下、該ペプチドを単に「170-179」と称することもある）、第188位から第196位の配列よりなるペプチド（配列番号：4、以下、該ペプチドを単に「188-196」と称することもある）、及び第158位から第165位の配列よりなるペプチド（配列番号：5、以下、該ペプチドを単に「158-165」と称することもある）についての実施例を以下に記載する。

## 【0082】

## 実施例5

Gly-Phe-Asp-Cys-Ala-Asn-Glu-Ser-Val-Leu (「170-179」、配列番号：3) の合成

樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin ( $0.57\text{mmol/g}$ 、 $100-200\text{mesh}$ )を用いた。この樹脂 $50\text{mg}$ を用いて、後記スケジュール1（表5）に従って合成を開始し、Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後スケジュール1の工程3まで

行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

【0083】

このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5% $H_2O$ 、2.5%エタンジチオール/TFA溶液) 1mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-A SH-363-5 (30φ×250mm) に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を240分で40%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Gly-Phe-Asp-Cys-Ala-Asn-Glu-Ser-Val-Leu 15.4mgを得た。

【0084】

得られたGly-Phe-Asp-Cys-Ala-Asn-Glu-Ser-Val-Leuは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AM-AM-303 (4.6φ×250mm) を用いた、0%から60%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.9分を示し、そのアミノ酸分析値 (Cysは検出できず) および質量分析値は理論値と一致した。

【0085】

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法：ニンヒドリン法

\*基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Asx : 1.98 (2)

Ser : 0.78 (1)

Glx : 1.01 (1)

Gly : 0.99 (1)  
 Ala : 1.00 (1)  
 \*Val : 1.00 (1)  
 Leu : 1.06 (1)  
 Phe : 1.01 (1)

## 質量分析 (FAB)

$[M+H]^+ : 1054$

【0086】

【表5】

## スケジュール 1

工程	時間 (分) × 処理回数
1. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
2. (脱保護) 50%ピペリジン/DMF	12 × 1
3. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 7
4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) /NMP溶液 0.9 ml、DIC (5当量) /NMP 溶液 0.3 ml	30 × 1
5. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) /NMP溶液 0.9 ml、DIC (5当量) /NMP 溶液 0.3 ml	30 × 1
7. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 4

【0087】

## 実施例 6

Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Phe-Thr-Lys-Leu (  
 「188-196」、配列番号: 4) の合成

先の実施例 5 と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin (0.  
 57 mmol/g、100-200 mesh) 50 mg を用いて、Fmoc-  
 Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ph

e-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し2回にわけ、Sep-pak Vac (C18)で精製した。すなわち、予め0.1% TFA水で平衡化させたカートリッジに注入し、0.1% TFA水10ml×3回で洗浄後、0.1% TFA水-アセトニトリル(1:1)10ml×3回で溶出した。溶出液を集め凍結乾燥し、Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Phe-Thr-Lys-Leu 37.5mgを得た。

## 【0088】

得られたGlu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Phe-Thr-Lys-Leuは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AM AM-303 (4.6φ×250mm)を用いた、0%から60%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間210.8分を示し、そのアミノ酸分析値(Cysは検出できず)および質量分析値は理論値と一致した。

## 【0089】

## アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法：ニンヒドリン法

\* 基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Thr : 0.93 (1)

Glx : 0.96 (1)

\* Leu : 2.00 (2)

Tyr : 0.83 (1)

Phe : 0.97 (1)

Lys : 1.88 (2)

## 質量分析 (FAB)

[M+H]<sup>+</sup> : 1144

## 【0090】

## 実施例7

Leu-Tyr-Gln-Ala-Val-Ala-Thr-Ile (「158-165」、配列番号：5) の合成

先の実施例5と同様にして、Fmoc-Ile-Alko Resin (0.62mmol/g、100-200mesh) 50mgを用いて、Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、先の実施例6と同様にしてSep-pak Vac (C18) で精製し、Leu-Tyr-Gln-Ala-Val-Ala-Thr-Ile 12.4mgを得た。

## 【0091】

得られたLeu-Tyr-Gln-Ala-Val-Ala-Thr-Ileは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AM AM-303 (4.6φ×250mm) を用いた、0%から60%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.2分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

## 【0092】

## アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法：ニンヒドリン法

\* 基準アミノ酸 ( ) 内理論値

Thr : 0.91 (1)

Glx : 1.03 (1)

Ala : 2.07 (2)

\* Val : 1.00 (1)

Ile : 0.99 (1)

Leu : 1.02 (1)

Tyr : 0.98 (1)

質量分析 (FAB)

[M+H]<sup>+</sup> : 878

【0093】

## 実施例 8

腫瘍抗原ペプチドの同定

先の実施例 5、6 及び 7 で合成した 3 種のペプチドについて、実施例 4 に記載の活性測定を行った結果を以下の表 6 に示す。

【0094】

【表 6】

パルスしたペプチド	KG-CTLが反応して産生した IFN- $\gamma$ 量 (pg/ml)
「158-165」	289
「170-179」	458
「188-196」	399
なし	117

【0095】

「158-165」、 「170-179」 及び 「188-196」 を、HLA-A2402 cDNA の組換えプラスミドをトランスフェクトした COS-7 細胞にパルスした結果、ペプチドをパルスしない場合よりも KG-CTL は高い反応性を示した。以上の結果より、「158-165」、「170-179」 及び 「188-196」 の 3 つのペプチドは、HLA-A24 拘束性の腫瘍抗原ペプチドとして機能していることが示された。

【0096】

## 実施例 9

腫瘍抗原ペプチドによる末梢血リンパ球からの CTL 誘導

実施例 5～実施例 7 で合成した 3 種のペプチドを用いて、末梢血リンパ球から抗原特異的な CTL が誘導できるか検討した。

HLA-A ロールカス が A24 のヘテロである健常人の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離した。24 穴プレートに  $2 \times 10^6$  細胞/穴となるようにリンパ球を加え、リンパ球培養液で培養した。培養液に前記腫瘍抗原ペプチドを  $10 \mu\text{M}$



になるように加え、末梢血リンパ球を刺激した。1週間後、X線照射（50 Gy）した約  $2 \times 10^5$  個の末梢血リンパ球とともに前記腫瘍抗原ペプチドを  $10 \mu\text{M}$  になるように加えて、2回目の刺激を行った。さらに1週間後、3回目の刺激を同様に繰り返した。3回目の刺激から1週間後、培養したリンパ球を回収した。腫瘍抗原タンパク質を発現しておりHLA-A2402陽性の白血病癌細胞株のMT-2を標的細胞（ $1 \times 10^4$  個）として、前記のリンパ球（ $8 \times 10^4$  個）が反応して産生する培養上清中のIFN- $\gamma$ 量をELISAで測定した。結果を以下の表7に示す。

【0097】

【表7】

抗原ペプチド	培養上清中のIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)
「158-165」	330
「170-179」	237
「188-196」	147
なし	3

【0098】

ペプチド無刺激の末梢血リンパ球は、標的細胞には反応しなかったが、3種類の抗原ペプチド「158-165」、「170-179」及び「188-196」で刺激した末梢血リンパ球は、標的細胞に反応してIFN- $\gamma$ を産生したことから、HLA-A24拘束性の抗原ペプチド特異的なCTLが誘導されていることが示された。

【0099】

なお本実験で用いたMT-2の代わりに、HLA-A24のcDNA発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入してペプチドをパルスした細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である（J.Exp.Med., 187:277,1998）。

【0100】

#### 配列表フリーテキスト

配列番号：19に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第10番目のアミノ

酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0101】

配列番号：2.0に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0102】

配列番号：2.1に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第8番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0103】

【発明の効果】

本発明により、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれらをin vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤または予防剤などを提供することができる。

【0104】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo; Sumitomo Pharmaceuticals Co.,Ltd.

<120> A Novel Tumor Antigen ART-1, and It's Tumor Antigen Peptides

<130> 132548

<160> 21

【0105】

<210> 1

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Asn	Leu	Gln	Arg	Tyr	Trp	Gly	Glu	Ile	Pro	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln
				5						10				15	
Thr	Asn	Arg	Ser	Ser	Phe	Asp	Leu	Leu	Pro	Arg	Glu	Phe	Arg	Leu	Val
				20					25					30	
Glu	Val	His	Asp	Pro	Pro	Leu	His	Gln	Pro	Ser	Ala	Asn	Lys	Pro	Lys
				35				40						45	
Pro	Pro	Thr	Met	Leu	Asp	Ile	Pro	Ser	Glu	Pro	Cys	Ser	Leu	Thr	Ile
				50			55				60				
His	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	His	Asn	Arg	Arg	Leu	Arg	Asn	Leu	Ile
				65			70				75			80	
Ala	Thr	Ala	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Gln	Gln	Thr	Glu	Gly	Val	Lys	Thr
				85					90					95	
Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Pro	Ser	Cys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Leu	Pro
				100					105					110	
Asp	Asp	Leu	Leu	Pro	Leu	Asp	Cys	Lys	Asn	Pro	Asn	Ala	Pro	Phe	Gln
				115					120					125	
Ile	Arg	His	Ser	Asp	Pro	Glu	Ser	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Lys	Gly	Glu
				130					135					140	
Pro	Val	Thr	Glu	Leu	Ser	Trp	His	Ser	Cys	Arg	Gln	Leu	Leu	Tyr	Gln
				145				150			155			160	
Ala	Val	Ala	Thr	Ile	Leu	Ala	His	Ala	Gly	Phe	Asp	Cys	Ala	Asn	Glu
				165					170					175	
Ser	Val	Leu	Glu	Thr	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	His	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys
				180					185					190	
Phe	Thr	Lys	Leu	Leu	Arg	Phe	Ala	Val	Asp	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Gly
				195					200					205	

Gln Thr Pro Phe Pro Asp Val Met Glu Gln Val Phe His Glu Val Gly  
 210 215 220  
 Ile Gly Ser Val Leu Ser Leu Gln Lys Phe Trp Gln His Arg Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr His Ser Tyr Met Leu Gln Ile Ser Lys Gln Leu Ser Glu Glu  
 245 250 255  
 Tyr Glu Arg Ile Val Asn Pro Glu Lys Ala Thr Glu Asp Ala Lys Pro  
 260 265 270  
 Val Lys Ile Lys Glu Glu Pro Val Ser Asp Ile Thr Phe Pro Val Ser  
 275 280 285  
 Glu Glu Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ser Gly Asp Gln Ser Leu Pro Met  
 290 295 300  
 Gly Val Leu Gly Ala Gln Ser Glu Arg Phe Pro Ser Asn Leu Glu Val  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Ser Pro Gln Ala Ser Ser Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu  
 325 330 335  
 Trp Asn Leu Ala His Val Lys Met Glu Pro Gln Glu Ser Glu Glu Gly  
 340 345 350  
 Asn Val Ser Gly His Gly Val Leu Gly Ser Asp Val Phe Glu Glu Pro  
 355 360 365  
 Met Ser Gly Met Ser Glu Ala Gly Ile Pro Gln Ser Pro Asp Asp Ser  
 370 375 380  
 Asp Ser Ser Tyr Gly Ser His Ser Thr Asp Ser Leu Met Gly Ser Ser  
 385 390 395 400  
 Pro Val Phe Asn Gln Arg Cys Lys Lys Arg Met Arg Lys Ile  
 405 410

[0106]

<210> 2

<211> 1711

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

acgcgatcct tgcctcaggc ctctcgaggt ccagacagcc gcccagcccg ctctgcgacg	60
cagcagtga tagtgtggtta cctccttgtc tcggttcagg tccagacctc cccgtcttcc	120
ggctgccctg aacgtcaggc gacctcagga cctgtgatt ggcgccctgcg ccggcggacc	180
gtgaccgagg aaacccctgg agggacttgg gcattccttg ggctccgtgc ctgttcttcg	240
tgctcctttc gggcaaggat ctcacattat cagtctttga ccgacacaga atgcctggca	300
tttgataaat gtttgttgaa ctigaagaga cataatggaca atg aat ctg caa aga	355

Met Asn Leu Gln Arg

5

tac tgg gga gag ata cca ata tca tca agc cag acc aac aga agt tcc	403
Tyr Trp Gly Glu Ile Pro Ile Ser Ser Ser Gln Thr Asn Arg Ser Ser	

10

15

20

ttc gat ttg ctc cca cgg gag ttc cgt ctg gtg gaa gtc cat gac cca	451
Phe Asp Leu Leu Pro Arg Glu Phe Arg Leu Val Glu Val His Asp Pro	

25

30

35

ccc ctg cac caa ccc tca gcc aac aag ccg aag ccc ccc act atg ctg	499
Pro Leu His Gln Pro Ser Ala Asn Lys Pro Lys Pro Pro Thr Met Leu	

40

45

50

gac atc ccc tca gag cca tgt agt ctc acc atc cat acg att cag ttg	547
Asp Ile Pro Ser Glu Pro Cys Ser Leu Thr Ile His Thr Ile Gln Leu	

55

60

65

att cag cac aac cga cgt ctt cgc aac ctt att gcc aca gct cag gcc	595
Ile Gln His Asn Arg Arg Leu Arg Asn Leu Ile Ala Thr Ala Gln Ala	

70

75

80

85

cag aat cag cag cag aca gaa ggt gta aaa act gaa gag agt gaa cct	643
Gln Asn Gln Gln Gln Thr Glu Gly Val Lys Thr Glu Glu Ser Glu Pro	

90

95

100

ctt ccc tgc tgc cct ggg tca cct cct ctc cct gat gac ctc ctg cct	691
Leu Pro Ser Cys Pro Gly Ser Pro Pro Leu Pro Asp Asp Leu Leu Pro	
105 110 115	
tta gat tgt aag aat ccc aat gca cca ttc cag aac cgg cac agt gac	739
Leu Asp Cys Lys Asn Pro Asn Ala Pro Phe Gln Ile Arg His Ser Asp	
120 125 130	
cca gag agt gac ttt tat cgt ggg aaa ggg gaa cct gtg act gaa ctc	787
Pro Glu Ser Asp Phe Tyr Arg Gly Lys Gly Glu Pro Val Thr Glu Leu	
135 140 145	
agc tgg cac tcc tgt cgg cag ctc ctc tac cag gca gtg gcc aca atc	835
Ser Trp His Ser Cys Arg Gln Leu Leu Tyr Gln Ala Val Ala Thr Ile	
150 155 160 165	
ctg gcc cac ggc agc ttt gag ctg tgc aat gag agt gtc ctg gag acc	883
Leu Ala His Ala Gly Phe Asp Cys Ala Asn Glu Ser Val Leu Glu Thr	
170 175 180	
cta act gat gtg gca cat gag tat tgc ctt aag ttt aac aag ttg ctg	931
Leu Thr Asp Val Ala His Glu Tyr Cys Leu Lys Phe Thr Lys Leu Leu	
185 190 195	
cgt ttt gct gtg gac cgg gag gcc cgg ctg gga cag act cct ttt cct	979
Arg Phe Ala Val Asp Arg Glu Ala Arg Leu Gly Gln Thr Pro Phe Pro	
200 205 210	
gat gtg atg gag cag gta ttc cat gaa gtg ggt att ggc agt gtg ctc	1027
Asp Val Met Glu Gln Val Phe His Glu Val Gly Ile Gly Ser Val Leu	
215 220 225	
tcc ctc cag aag ttc tgg cag cac cgc atc aag gac tat cac agt tac	1075
Ser Leu Gln Lys Phe Trp Gln His Arg Ile Lys Asp Tyr His Ser Tyr	
230 235 240 245	
atg cta cag att agt aag caa ctc tct gaa gaa tat gaa agg att gtc	1123
Met Leu Gln Ile Ser Lys Gln Leu Ser Glu Glu Tyr Glu Arg Ile Val	

250	255	260	
aat cct gag aag gcc aca gag gac gct aaa cct gtg aag atc aag gag			1171
Asn Pro Glu Lys Ala Thr Glu Asp Ala Lys Pro Val Lys Ile Lys Glu			
265	270	275	
gaa cct gtg agc gac atc act ttt cct gtc agt gag gag ctg gag gct			1219
Glu Pro Val Ser Asp Ile Thr Phe Pro Val Ser Glu Glu Leu Glu Ala			
280	285	290	
gac ctt gct tct gga gac cag tca ctg cct atg gga gtg ctt ggg gct			1267
Asp Leu Ala Ser Gly Asp Gln Ser Leu Pro Met Gly Val Leu Gly Ala			
295	300	305	
cag agc gaa cgc ttc cca tct aac ctg gag gtt gaa gct tca cca cag			1315
Gln Ser Glu Arg Phe Pro Ser Asn Leu Glu Val Glu Ala Ser Pro Gln			
310	315	320	325
gct tca agt gca gag gta aat gct tct cct ctt tgg aat ctg gcc cat			1363
Ala Ser Ser Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Trp Asn Leu Ala His			
330	335	340	
gtg aaa atg gag cct caa gaa agt gaa gaa ggc aat gtc tct ggg cat			1411
Val Lys Met Glu Pro Gln Glu Ser Glu Glu Gly Asn Val Ser Gly His			
345	350	355	
ggg gtg ctg ggc agt gat gtc ttc gag gag cct atg tca ggc atg agt			1459
Gly Val Leu Gly Ser Asp Val Phe Glu Glu Pro Met Ser Gly Met Ser			
360	365	370	
gaa gct ggg att cct cag agc cct gat gac tca gat agc agc tat ggt			1507
Glu Ala Gly Ile Pro Gln Ser Pro Asp Asp Ser Asp Ser Ser Tyr Gly			
375	380	385	
tcc cac tcc act gac agc ctc atg ggg tcc tcc cct gtt ttc aac cag			1555
Ser His Ser Thr Asp Ser Leu Met Gly Ser Ser Pro Val Phe Asn Gln			
390	395	400	405
cgc tgc aag aag agg atg agg aaa ata taaaaggaaa agagggagat			1602

Arg Cys Lys Lys Arg Met Arg Lys Ile

410

gtttgtcca gacctactag acccaacaga aaaggttttt gtattagaat ctgtttcctt 1662

aaaaattgat ttgactcctg ttcttaaaaaa~~aaaaaaaaaaaa~~ 1711

【0 1 0 7】

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Phe Asp Cys Ala Asn Glu Ser Val Leu

5

10

【0 1 0 8】

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Tyr Cys Leu Lys Phe Thr Lys Leu

5

【0 1 0 9】

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Tyr Gln Ala Val Ala Thr Ile

5

【0 1 1 0】



<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Phe Asp Leu Leu Pro Arg Glu Phe

5

【0 1 1 1】

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Phe Asp Leu Leu Pro Arg Glu Phe Arg Leu

5

10

【0 1 1 2】

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Leu Tyr Gln Ala Val Ala Thr Ile Leu

5

【0 1 1 3】

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Tyr Cys Leu Lys Phe Thr Lys Leu Leu

5

10

【 0 1 1 4 】

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Phe Ala Val Asp Met Glu Gln Val Phe

5

10

【 0 1 1 5 】

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Phe Pro ~~Asp~~ Val ~~Met~~ Glu ~~Gln~~ Val ~~Phe~~

5

10

【 0 1 1 6 】

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Val Phe His ~~Glu~~ Val Gly Ile ~~Gly~~ Ser Val Leu

5

10

【 0 1 1 7 】

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Tyr His Ser Tyr Met Leu Gln Ile

5

【0 1 1 8】

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Tyr Met Leu Gln Ile Ser Lys Gln Leu

5

10

【0 1 1 9】

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Tyr Gly Ser His Ser Thr Asp Ser Leu

5

10

【0 1 2 0】

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Tyr Trp Gly Glu Ile Pro Ile

5

【0121】

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Phe Thr Lys Leu Leu Arg Phe

5

【0122】

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Phe Pro Val Ser Glu Glu Leu

5

【0123】

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 19

Gly Xaa Asp Cys Ala Asn Glu Ser Val Xaa

5

10

【 0 1 2 4 】

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 20

Glu Xaa Cys Leu Lys Phe Thr Lys Xaa

5

【 0 1 2 5 】

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 21

Leu Xaa Gln Ala Val Ala Thr Xaa

5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれらを *in vivo* または *in vitro* で利用した腫瘍の治療剤または予防剤を提供する。

【解決手段】 新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、*in vivo* または *in vitro* で利用した腫瘍の治療剤または予防剤。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年12月 1日

【特許出願人】

【識別番号】 596094371

【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

【氏名又は名称】 伊東 恭悟

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100107629

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友製薬株式会社 知的財産部内

【氏名又は名称】 中村 敏夫



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[596094371]

1. 変更年月日 1996年 6月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

氏 名 伊東 恭悟

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社